

Anna Król<sup>1</sup>

Maciej Ostrowski<sup>2,✉</sup>

<sup>1</sup>Katedra Chemii Środowiska i Bioanalizy, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

<sup>2</sup>Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

✉ Zakład Biochemii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, ul. Lwowska 1, 87-100 Toruń; tel.: (56) 611 45 42, e-mail: maciejost@umk.pl

Artykuł otrzymano 28 sierpnia 2017 r.  
Artykuł zaakceptowano 12 września 2017 r.

**Słowa kluczowe:** fosfolipaza A<sub>2</sub>, fosfolipidy, neurotoksyny, czynnik krzepnięcia Xa

**Wykaz skrótów:** CaM – kalmodulina; COX – cyklooksygenaza; cPLA<sub>2</sub> – cytosolowa fosfolipaza A<sub>2</sub> zależna od Ca<sup>2+</sup>; CRD – domena rozpoznająca węglowodany; IL6 – interleukina 6; iPLA<sub>2</sub> – cytosolowa fosfolipaza A<sub>2</sub> niezależna od Ca<sup>2+</sup>; sPLA<sub>2</sub> – sekrecyjna fosfolipaza A<sub>2</sub>

## STRESZCZENIE

Fosfolipazy są enzymami biorącymi udział w procesie degradacji lipidów błon komórkowych. Fosfolipazy podzielono na cztery grupy- A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C oraz D, w zależności od rodzaju i położenia wiązania w obrębie cząsteczki fosfolipidu, na który działają. Fosfolipazy A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) katalizują reakcję hydrolizy glicerofosfolipidów w pozycji *sn*-2 uwalniając lizofosfolipid oraz kwas tłuszczowy. Enzymy te są odpowiedzialne za tworzenie wewnątrzkomórkowych cząsteczek sygnałowych, takich jak metabolity kwasu arachidonowego, biorą udział w procesie endo- i egzocytozy oraz reorganizacji cytoszkieletu, a także pełnią szereg funkcji niezwiązanych z ich właściwościami enzymatycznymi. Intrygującym zagadnieniem jest, niezależne od aktywności katalitycznej, oddziaływanie niektórych sekrecyjnych PLA<sub>2</sub> obecnych w jadach węży z różnymi białkami, np. czynnikiem krzepnięcia Xa lub kanałem chlorkowym CFTR. W niniejszej pracy omówiono klasyfikację fosfolipaz, mechanizm aktywności katalitycznej oraz niektóre przykłady oddziaływań sekrecyjnych PLA<sub>2</sub> z białkami akceptorowymi.

## WPROWADZENIE

Fosfolipazy z grupy A<sub>2</sub> są enzymami, które degradują fosfolipidy do kwasu tłuszczowego oraz lizofosfolipidu [1]. Rodzina fosfolipaz A<sub>2</sub> składa się z wielu grup oraz podgrup, które zostały podzielone na trzy główne typy: fosfolipazy sekrecyjne (sPLA<sub>2</sub>), fosfolipazy cytosolowe (cPLA<sub>2</sub>) oraz fosfolipazy cytosolowe niezależne od Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>). Poszczególne sPLA<sub>2</sub> mają różną lokalizację oraz właściwości enzymatyczne, co świadczy o tym, że pełnią one różnorodne funkcje biologiczne. Fosfolipazy stanowią również jeden z głównych składników jadów węży z rodziny żmijowatych (*Viperidae*).

Z uwagi na fakt, że częstym produktem aktywności fosfolipaz A<sub>2</sub> jest kwas arachidonowy, sekrecyjne PLA<sub>2</sub> uważane są za czynniki uczestniczące w metabolizmie cząsteczek sygnałowych z grupy eikozanoidów. Odkrycie białek specyficznie oddziałujących z sPLA<sub>2</sub> pozwoliło na stwierdzenie, że fosfolipazy pełnią także funkcje biologiczne niezależne od ich aktywności enzymatycznej. Fakt, iż sekrecyjne fosfolipazy A<sub>2</sub> grupy IIA oddziałują z wysokim powinowactwem z różnymi białkami czyni je ważnymi cząsteczkami w badaniach molekularnych mechanizmów chorób.

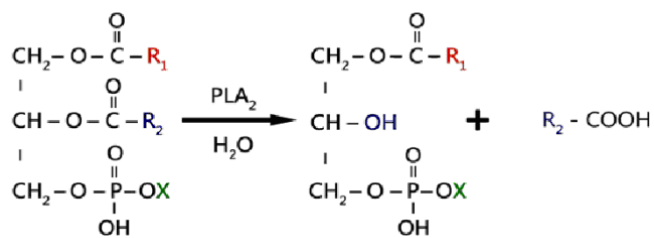
## PODZIAŁ I WYSTĘPOWANIE FOSFOLIPAZ Z GRUPY A<sub>2</sub>

Fosfolipazy z grupy A<sub>2</sub> są enzymami należącymi (EC 3.1.1.4) do acylohydro-laz i katalizują hydrolizę wiązania estrowego w pozycji *sn*-2 glicerofosfolipidów [2]. Podczas tej reakcji powstaje kwas tłuszczowy (np. kwas arachidonowy) oraz lizofosfolipid (Ryc. 1).

Do tej pory zidentyfikowano 3 główne typy: 1) fosfolipazy sekrecyjne (sPLA<sub>2</sub>); 2) fosfolipazy cytosolowe zależne od Ca<sup>2+</sup> (cPLA<sub>2</sub>); 3) najmniej poznane fosfolipazy cytosolowe niezależne od Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>).

Podstawą klasyfikacji PLA<sub>2</sub> jest sekwencja nukleotydomowa ich genów oraz sekwencja aminokwasowa odpowiednich izoenzymów. Oba rodzaje fosfolipaz cytosolowych (cPLA<sub>2</sub> oraz iPLA<sub>2</sub>) zaliczamy do fosfolipaz wewnątrzkomórkowych [3]. Fosfolipazy A<sub>2</sub> występują powszechnie w wielu narządach ssaków, takich jak różne regiony mózgu, płuca, serce, śledziona, trzustka, a także w tkankach śródłonka, mięśniach prążkowanych i gładkich, tkance glejowej oraz komórkach jądrzastych krwi.

Fosfolipazy sekrecyjne A<sub>2</sub> (ang. *secreted phospholipase A<sub>2</sub>*) to białka enzymatyczne o masie cząsteczkowej od 14 do 18 kDa, które zawierają około 6-8 mostków disiarczkowych stabilizujących prawidłową strukturę III-rzędową



**Rycina 1.** Reakcja katalizowana przez fosfolipazę A<sub>2</sub>; R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub> oznaczają reszty acylowe kwasów tłuszczowych, natomiast X to reszta hydroksylowa innego alkoholu połączonego z ortofosforanem (wykonano na podstawie [1]).

enzymu [1]. Ich centrum aktywne zbudowane jest z His48 oraz Asp99, a do zajścia reakcji enzymatycznej niezbędne jest milimolowe stężenie jonów wapnia, które zostają związane przez reszty tyrozyny oraz glicyny tzw. pętli wapniowej [3]. Nieobecność dwuwartościowego jonu wapnia powoduje nieprawidłowe związanie substratu z centrum katalitycznym enzymu [4].

Pierwszą fosfolipazę sekrecyjną wyizolowano ponad sto lat temu z jadu kobry i zaliczono ją do grupy IA [1]. Kolejną zbadaną sPLA<sub>2</sub> była ta uzyskana z trzustki wołu (zaliczona do grupy IB), którą można także znaleźć u innych ssaków. U pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, w maziach stawowych znaleziono fosfolipazy sekrecyjne, które różnią się od PLA<sub>2</sub> z trzustki. Dalsze badania nad tą grupą enzymów wykazały, iż istnieje 17 podgrup należących do sPLA<sub>2</sub>, z których 10 zidentyfikowano u ssaków. Genom ludzki zawiera 9 genów kodujących fosfolipazy sekrecyjne, natomiast w genomie myszy zlokalizowano 10 takich genów, włączając w to gen fosfolipazy IIC, która u ludzi funkcjonuje jako pseudogen. Podsumowując, do fosfolipaz sekrecyjnych zaliczamy następujące grupy: IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII oraz XVI. Klasyfikację fosfolipaz sekrecyjnych przedstawiono w tabeli 1.

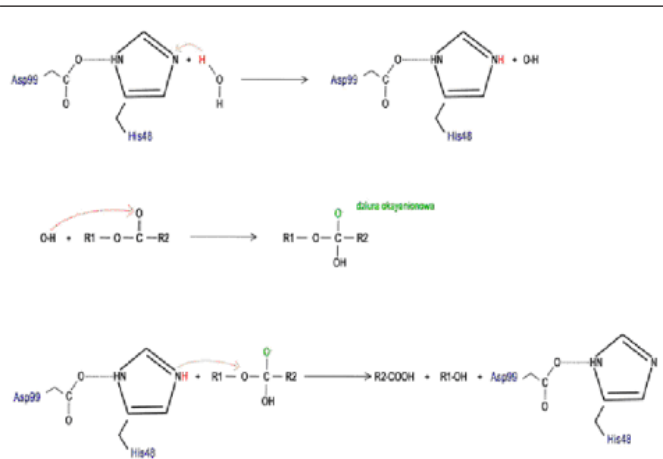
**Tabela 1.** Klasyfikacja sekrecyjnych fosfolipaz A<sub>2</sub> (fosfolipazy występujące u ssaków zaznaczono kolorem czerwonym) (na podstawie [1]).

Grupa sPLA <sub>2</sub>	Masa cząsteczkowa (kDa)	Liczba mostków dwusiarczkowych
IA	13–15	7
IB	13–15	7
IIA	13–15	7
IIB	13–15	6
IIC	15	8
IID	14–15	7
IIE	14–15	7
IIF	16–17	6
III	15–18	8
V	14	6
IX	14	6
X	14	8
XIA	12,4	6
XIB	12,9	6
XII	19	7
XIII	<10	0
XIV	13–19	2

Fosfolipaza trzustkowa jest syntetyzowana oraz wydzielana przez trzustkę do jelita w postaci zymogenu, czyli nieaktywnego prekursora enzymu, który ulega aktywacji pod wpływem proteolizy. Charakteryzuje się ona niską specyficznością substratową (nie jest dla niego istotny kwas tłuszczowy w pozycji *sn*-2 ani polarny podstawnik w pozycji *sn*-3), co pozwala na trawienie lipidów pokarmowych z dużą wydajnością. Oprócz obecności w trzustce, enzym możemy także znaleźć w śledzionie oraz płucach [5]. Fosfolipazy sekrecyjne, w porównaniu do tych pochodzenia trzustkowego, są syntetyzowane jako dojrzałe białka, zdolne do katalizy i magazynowane w pęcherzykach wewnątrzkomórkowych [6]. Enzymy z tych dwóch grup różnią się od siebie także specyficznością substratową, bowiem „nietrzustkowe” sPLA<sub>2</sub> mimo małej swoistości wobec kwasu tłuszczowego w pozycji *sn*-2, preferują hydrolizę fosfolipidów zawierających resztę etanoloaminy. Fosfolipazy grupy II powszechnie występują w tkankach ssaków, a jest ich najwięcej w płytkach krwi oraz maziach stawowych. Enzymy te pełnią liczne funkcje w indukcji stanów patologicznych, bowiem katalizują powstawanie lipidowych mediatorów stanów zapalnych.

Grupa fosforanowa (-PO<sub>3</sub>OH) w cząsteczce każdego fosfolipidu jest w warunkach fizjologicznych zjonizowana, ma więc ładunek ujemny i to ona decyduje o wypadkowym ładunku całej cząsteczki fosfolipidu, a co za tym idzie, ma wpływ na ładunek powierzchniowy błony biologicznej [1,2,5]. Oddziaływania pomiędzy resztami aminokwasowymi enzymu a ujemnie naładowaną powierzchnią substratu pełnią kluczową rolę w przeprowadzeniu reakcji enzymatycznej przez fosfolipazy sekrecyjne. Na podkreślenie zasługuje fakt, że fosfolipazy wykazują kinetykę „enzymów powierzchniowych”, są bowiem białkami rozpuszczalnymi, ale degradują substraty stanowiące część dwuwarstwy lipidowej błony [5]. Kataliza enzymatyczna z udziałem PLA<sub>2</sub> zachodzi zatem na granicy faz: wodnej i lipidowej, co komplikuje model typowej kinetyki Michaelisa-Menten.

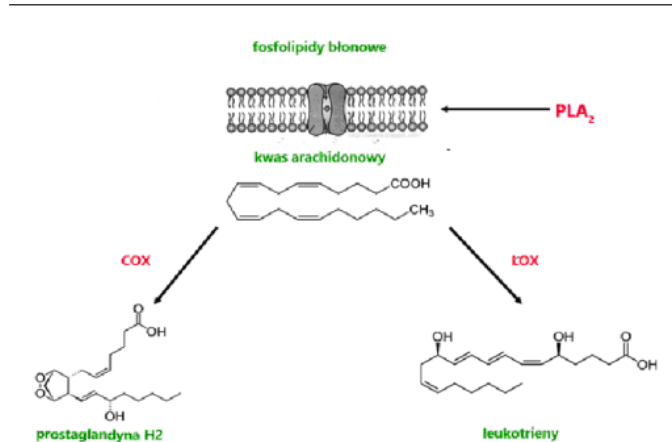
Mechanizm działania fosfolipaz sekrecyjnych można przedstawić za pomocą dwóch modeli zaprezentowanych w pracy przeglądowej [1]. Pierwszy z nich, zwany jest modelem powierzchniowym i stosowany jest zazwyczaj przy badaniach fosfolipaz *in vitro*, gdy do badanego roztworu dodawany jest detergent (np. Triton X-100). Zakłada on występowanie aktywnego katalitycznego enzymu w kompleksie z detergentem. Drugi z proponowanych modeli mówi, że fosfolipazy przyłączają się bezpośrednio do powierzchni substratu, czyli fosfolipidów błonowych i przeprowadzają reakcję hydrolizy. Kolejne informacje umożliwiające wgląd w dokładny molekularny mechanizm działania fosfolipazy sekrecyjnej A<sub>2</sub> uzyskano dzięki wyznaczeniu struktury przestrzennej tego białka [4]. Centrum aktywne zbudowane jest z reszty histydy-48 oraz reszty kwasu asparaginowego-99. Grupa aminowa pierścienia imidazolowego His48 połączona jest wiązaniem wodorowym z grupą karboksylową Asp99. Ten układ nazywany jest diadą katalityczną.



Rycina 2. Schemat katalizy enzymatycznej przeprowadzanej przez fosfolipazy sekrecyjne  $A_2$  (wykonano na podstawie [4]).

Kataliza enzymatyczna przy udziale fosfolipaz sekrecyjnych została przedstawiona została na rysunku 2. Histydyna-48 odrywa proton z cząsteczki wody, który zostaje przyłączony do protonu N1 tego aminokwasu. Tym samym woda staje się silnym nukleofilem i jest zdolna do ataku na wiązanie estrowe w pozycji *sn-2* fosfolipidu. Ujemnie naładowana reszta hydroksylowa atakuje atom węgla grupy karbonylowej substratu i tworzy się tetraedryczny produkt pośredni. Przeniesienie protonu z obdarzonej ładunkiem dodatnim histydyny-48 na tlen pomostowy (ang. *bridging oxygen*) z tetraedrycznego produktu pośredniego skutkuje uwolnieniem kwasu tłuszczowego z pozycji *sn-2* substratu [4,7]. W porównaniu z innymi enzymami stosującymi w katalizie atak nukleofilowy (np. z proteazami serynowymi), fosfolipazy sekrecyjne nie tworzą produktu pośredniego zwanego acyloenzymem.

Wiązanie się fosfolipaz z lipidami błonowymi jest związane ze zmianami stężenia jonów wapnia w cytoplazmie. Wrażliwość na wapń wynika z obecności w tych białkach enzymatycznych odpowiednich domen wiążących kationy wapniowe, takich jak chociażby obecna w fosfolipazach cytosolowych domena C2 [5]. Fosfolipazy sekrecyjne również wymagają milimolowego stężenia jonów wapnia do zajścia katalizy. Nieobecność dwuwartościowego jonu wapnia powoduje nieprawidłowe wiązanie substratu do centrum aktywnego enzymu [4]. Większość z fosfolipaz sekrecyjnych posiada w swojej budowie pętlę wiążącą jony wapnia (ang. *calcium binding loop*), która została zaznaczona schematycznie na rycinie 2 [1]. Kation  $Ca^{2+}$  podczas katalizy prowadzonej przez sPLA<sub>2</sub> związany jest w centrum aktywnym w dwóch pozycjach. Pierwsza z nich zapewnia stabilizację oksyanionu w tetraedrycznym produkcie pośrednim, druga natomiast wiąże jon wapnia z tlenem reszty fosforanowej znajdującej się w pozycji *sn-3* substratu [4]. Jony  $Ca^{2+}$  przyłączają się zarówno do reszty kwasu asparaginowego znajdującego się w centrum aktywnym, jak też do węgla grupy karbonylowej tyrozyny i glicyny pochodzących z pętli wiążącej wapń [1]. Jeden z modeli działania PLA<sub>2</sub> zakłada, że w wyniku związania  $Ca^{2+}$  z cząsteczką enzymu, ekspozycji ulegają rejony hydrofobowe w cząsteczce fosfolipazy, dzięki czemu białko enzymatyczne w niewielkim stopniu może zagłębiać się w błonę biologiczną [7].



Rycina 3. Kaskada kwasu arachidonowego (schemat wykonano na podstawie [8]).

## ENZYMATYCZNE FUNKCJE PLA<sub>2</sub>

Jedną z głównych funkcji fosfolipaz sekrecyjnych jest kataliza uwalniania kwasu arachidonowego z błon biologicznych. Aktywacja tego enzymu jest kluczowym procesem dla regulacji całej kaskady kwasu arachidonowego [8]. Do aktywacji PLA<sub>2</sub> dochodzi pod wpływem różnych bodźców takich jak cytokiny, mitogeny oraz hormony. Uwolniony kwas arachidonowy jest dalej metabolizowany przez cyklooksyzgenazę (COX) lub lipooksyzgenazę (LOX) (Ryc. 3). Cyklooksyzgenaza katalizuje proces syntezy prostaglandyny H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), prekursora prostaglandyn, prostacykliny i tromboksanu. Wzrost ekspresji genu COX jest charakterystyczny dla zapalenia, zmian zwyrodnieniowych i nowotworowych. Lipooksyzgenaza to enzym katalizujący przyłączenie tlenu w pozycjach 5, 12 i 15 kwasu arachidonowego powodując powstanie leukotrienów. Produkty reakcji katalizowanych przez oba enzymy są metabolitami bardzo aktywnymi fizjologicznie.

Biosynteza prostaglandyn może przyczyniać się do wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu (ROS), co wskazuje na udział fosfolipaz sekrecyjnych w stresie oksydacyjnym. Wolny kwas arachidonowy i jego metabolity mogą powodować obniżenie stężenia zredukowanego glutationu (GSH), który jest ważnym antyoksydantem w naszym organizmie. Wzrost aktywności sPLA<sub>2</sub> prowadzi do ekspresji syntazy tlenu azotu (iNOS) indukowanej przez cytokiny w neuronach i komórkach glejowych. Warte uwagi jest także to, że jednym z markerów stresu oksydacyjnego występującego we wczesnym rozwoju chorób neurodegeneracyjnych jest obniżenie stężenia wcześniej wspomnianego glutationu związane z aktywnością fosfolipaz sekrecyjnych, a sPLA<sub>2</sub> odgrywa istotną rolę w regulacji syntezy iNOS w chorobach neurodegeneracyjnych [9]. Fosfolipazy uczestniczą także w procesach zapalnych związanych z miażdżycą tętnic, reumatoidalnym zapaleniem stawów oraz ostrym zawałem mięśnia sercowego.

## NIEENZYMATYCZNE FUNKCJE PLA<sub>2</sub>

W przeciwieństwie do aktywności katalitycznej sekrecyjnych fosfolipaz  $A_2$ , której rola w metabolizmie i patofiz-

zjologii jest dobrze udokumentowana, znacznie skromniej przedstawia się stan wiedzy na temat funkcji sPLA<sub>2</sub> niezwiązanych z ich właściwościami enzymatycznymi. Oprócz swojej aktywności enzymatycznej, fosfolipazy sekrecyjne znajdujące się w jadzie węży *Viperidae*, mogą wiązać się z różnego rodzaju białkami, a także z niebiałkowymi substratami [10]. Zidentyfikowano kilka białek wiążących sPLA<sub>2</sub>: receptor fosfolipazy typu M, presynaptyczny receptor typu N, kalmodulina (CaM), czynnik wzrostu, naturalne inhibitory fosfolipaz z krwi jadowitych węży czy też czynnik krzepnięcia krwi X (FXa). Oddziaływania te związane są z właściwościami patofizjologicznymi oraz farmakologicznymi fosfolipaz, do których należy zaliczyć neurotoksyczność, miotoksyczność, kardiotoxyczność, nekrozę narządów oraz działanie antykoagulacyjne.

#### BIAŁKA SPECYFICZNIE ODDZIAŁUJĄCE Z FOSFOLIPAZAMI

Fosfolipazy sekrecyjne występujące w jadach różnych gatunków węży jadowitych posiadają specyficzne białkowe receptory podobne do receptora mannozowego u ssaków. Dwa główne receptory o wysokim powinowactwie to receptory typu N i typu M, które zostały dokładnie scharakteryzowane dzięki użyciu dwóch izoform sPLA<sub>2</sub>, OS<sub>1</sub> i OS<sub>2</sub>, uzyskanych i oczyszczonych z jadu węża *Oxyuranus scutellatus scutellatus* [11].

Receptor typu M to białko o masie cząsteczkowej 180 kDa, które ma wysokie powinowactwo zarówno do formy OS<sub>1</sub> jak i OS<sub>2</sub> fosfolipaz sekrecyjnych, co może sugerować, że enzymy te są fizjologicznym ligandem tego receptora [11]. Receptor ten należy do transbłonowych glikoprotein typu I oraz do rodziny zależnych od Ca<sup>2+</sup> receptorów mannozowych. Jako jedyny spośród białek wiążących neurotoksyny, receptor typu M zlokalizowany jest w błonie plazmatycznej i najprawdopodobniej to właśnie on pełni główną rolę w specyficznym związaniu sPLA<sub>2</sub> w komórkach nerwowych. Zewnątrzkomórkowa część receptora M zawiera osiem domen lektynowych (CTLDS), z których najważniejszą dla związania substratu jest domena CTLD5. W zależności od typu komórki oraz rodzaju neurotoksyny przyłączonej do receptora typu M wywołany może zostać różny efekt, jak na przykład wzrost komórek, ich proliferacja lub migracja, produkcja lipidowych mediatorów, wydzielanie hormonów, czy też produkcja cytokin.

Drugim białkiem wiążącym PLA<sub>2</sub> jest obecny w błonach neuronów receptor typu N [12]. Ligandem tego receptora jest jedynie polipeptyd OS<sub>2</sub>. Jego fizjologiczna funkcja nie jest do końca poznana, jednak wiadomo, że odgrywa on rolę w toksycznym działaniu sPLA<sub>2</sub>.

#### NEUROTOKSYCZNE WŁAŚCIWOŚCI PLA<sub>2</sub> Z JADÓW WĘŻY RODZINY VIPERIDAE

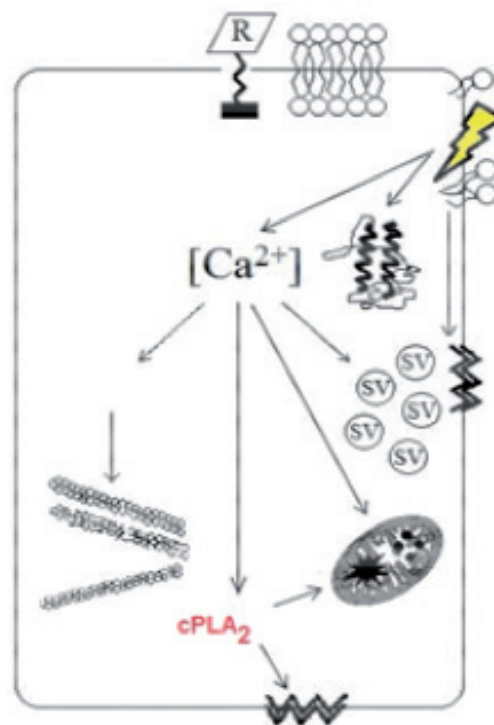
Neurotoksyny obecne w jadach węży z rodziny *Viperidae* to białka presynaptyczne w większości pochodzące z grupy IIA sPLA<sub>2</sub>. Zbudowane są one z pojedynczego łańcucha (kardoksyna z jadu *Bitis caudalis*, ammodytoksyna z *Vipera ammodytes*) lub z dwóch łańcuchów polipeptydowych jak np. β-bungarotoksyna z *Bungarus multicinctus*. Mogą także tworzyć kompleksy oligomeryczne, np. krotoksyna z

jadu *Crotalus durissus terrificus* jest heterodimerem [13,22]. Krotoksyna zbudowana jest z dwóch podjednostek, podjednostki CB złożonej głównie z reszt aminokwasów zasadowych oraz CA. Na podjednostkę CB składa się centrum aktywne fosfolipazy (złożone z reszt His48 i Asp99), pętla wiążąca wapń oraz siedem mostków disiarczkowych. Natomiast podjednostka CA, którą tworzą w większości reszty aminokwasów kwasowych, zbudowana jest z trzech, kowalencyjnie ze sobą związanych, łańcuchów polipeptydowych-α, β i γ i nie wykazuje aktywności enzymatycznej.

Istnieją także toksyny występujące jako trimery, np. tapoksyna z *Oxyuranus scutellatus*, a także pentamery (tekstylotoksyna z *Pseudonaja textillis*) [14,22]. Większość z nich charakteryzuje się obecnością kilku izoform różniących się nieznacznie sekwencją aminokwasową.

Najbardziej prawdopodobny mechanizm działania neurotoksyn został przedstawiony na rycinie 4. Zgodnie z tym schematem neurotoksyna łączy się z wysokim powinowactwem z receptorem białkowym znajdującym się w błonie lub z niskim powinowactwem z domeną lipidową [15]. Pod wpływem aktywności enzymatycznej fosfolipaz następuje hydroliza fosfolipidów błonowych, błona traci swój potencjał i staje się przepuszczalna dla jonów. Wzrost stężenia jonów Ca<sup>2+</sup> w cytoplazmie powoduje zaburzenia w działaniu istotnych organelli komórkowych (mitochondriów). Dodatkowo aktywowane zostają zależne od wapnia proteazy, które degradują cytoszkielet. Kolejnym krokiem jest aktywacja cytosolowych fosfolipaz zależnych od wapnia, które hydrolizują wewnątrzkomórkowe błony, powodując dezintegrację komórki nerwowej.

Argumentem skłaniającym do przyjęcia tezy o oddziaływaniu sPLA<sub>2</sub> z receptorami neuroprzekaźników jest wyka-



Rycina 4. Działanie sPLA<sub>2</sub> na komórkę nerwową; SV – pęcherzyki synaptyczne; R – receptor błonowy (wykonano na podstawie [15]).

zanie, iż izoforma podjednostki CBd (składnika krotoksyny z jadu grzechotnika) blokuje kanał jonowy bramkowany ligandem pLGIC [16]. Pentameryczne LGIC są obecne w błonach postsynaptycznych połączeń nerwowo-nerwowych oraz nerwowo-mięśniowych, jak również w komórkach bakterii. Kanały jonowe obecne u cyjanobakterii *Glebacter violaceus* są homologami eukariotycznych receptorów jonotropowych (np. receptora acetylocholino) [17].

Analizy przeprowadzone z użyciem powierzchniowego rezonansu plazmonów (SPR, ang. *surface plasmon resonance*) wykazały, że CB, jak również jej homolog, sekrecyjna PLA<sub>2</sub> człowieka, oddziałują specyficznie z GLIC [16]. Wiązanie fosfolipazy z cząsteczką receptora ma miejsce w obrębie domeny zewnątrzkomórkowej GLIC (ECD, ang. *extracellular domain*). Na podstawie analizy sedymentacji kompleksu CB-GLIC można przypuszczać, że każda podjednostka pentameru GLIC wiąże dwie cząsteczki CB. Badania elektrofizjologiczne ujawniły, że związanie CB do receptora hamuje przepływ jonów przez kanał. Oddziaływanie GLIC z CB nie pozostaje bez wpływu na aktywność enzymatyczną PLA<sub>2</sub>. Szybkość hydrolizy fosfolipidu przez CB rośnie w przypadku dodania doń GLIC. Nie można wykluczyć, iż zgodnie z zaproponowanym modelem stechiometrii kompleksu, 2 cząsteczki CB: 1 podjednostka GLIC, zwiększona aktywność katalityczna wynika z lepszej ekspozycji centrum aktywnego PLA<sub>2</sub> na substrat w kompleksie. Kwestia wpływu receptora GLIC na aktywność oddziałującej z nim PLA<sub>2</sub> pozostaje otwarta, bowiem wbrew sugerowanej oligomeryzacji CB w kompleksie z GLIC, kinetyka reakcji katalizowanej przez ten enzym w tych warunkach zachowuje charakter hiperboliczny. Jedną z hipotez zakłada, że fosfolipaza w kompleksie z receptorem hydrolizuje fosfolipidy błonowe, a produkty aktywności enzymatycznej regulują allosterycznie kanał jonowy.

#### PLA<sub>2</sub> REGULUJE I KORYGUJE FUNKCJĘ ΔF508CFTR

Innym białkiem, które pełni funkcję kanału jonowego jest CFTR, którego zmutowana postać (ΔF508CFTR) jest jedną z przyczyn mukowiscydozy. Również w przypadku tego białka wykazano, że fosfolipaza A<sub>2</sub> z grzechotnika wiąże się swoiście, co ciekawe, z wyższym powinowactwem z mutantem CFTR niż formą dziką [18]. W myśl hipotezy zaproponowanej przez autorów tej pracy, PLA<sub>2</sub> oddziałując z ΔF508CFTR zapobiega jego degradacji proteosomalnej korygując tym samym dysfunkcję wynikającą z mutacji. Analizy SPR wykazały, że CB wiąże się do jednej z wewnątrzkomórkowych domen przyłączających nukleotyd (NBD1) białka CFTR. W efekcie tych oddziaływań, rośnie natężenie prądu chlorkowego przez kanał CFTR. Co ciekawe, sekrecyjna PLA<sub>2</sub> człowieka, homolog CB grzechotnika, wywołuje efekt odwrotny, hamuje przepływ jonów przez kanał. Oprócz aktywacji prądu chlorkowego, CB pełni także funkcję korektora. Zgodnie z zaproponowanym modelem CB konkuruje z cytokeratyną 8 (C8) o wiązanie z ΔF508CFTR. Zadaniem cytokeratyny 8 jest skierowanie zmutowanego białka na drogę degradacji proteosomalnej. Przyłączenie CB do ΔF508CFTR w siateczce endoplazmatycznej zapobiega związaniu C8 i kanał chlorkowy trafia do błony komórkowej, gdzie oddziałująca z nim podjednostka CB zwiększa prąd jonowy. Podwójna rola PLA<sub>2</sub> z grzechotnika nie wy-

nika z jej aktywności enzymatycznej, a oddziaływanie CB z NBD1-CFTR nie zmienia szybkości reakcji katalizowanej przez enzym. Interesującą kwestią jest problem internalizacji sPLA<sub>2</sub> do wnętrza komórki nabłonkowej, jak bowiem udowodniono, CB oddziałuje z domeną CFTR eksponowaną po stronie cytoplazmatycznej.

#### ANTYKOAGULACYJNE WŁAŚCIWOŚCI PLA<sub>2</sub> – HAMOWANIE CZYNNIKA KRZEPNIĘCIA Xa

Czynnik krzepnięcia Xa to heterodimer składający się z dwóch łańcuchów polipeptydowych (łańcucha lekkiego i ciężkiego), które są połączone ze sobą kowalencyjnie poprzez pojedynczy mostek disiarczkowy [19]. Łańcuch ciężki zbudowany jest z domeny proteazy serynowej i zawiera centrum aktywne, składające się z triady katalitycznej His223, Asp282 i Ser 379. Łańcuch lekki zawiera na N-końcu domenę GLA, charakteryzującą się obecnością kwasu γ-karboksyglutaminowego, która wykazuje wysokie powinowactwo wobec jonów wapnia.

Jad węży zawiera różne składniki, wykazujące działanie stymulujące lub hamujące mechanizmy hemostatyczne, do których zalicza się krzepnięcie krwi [19]. Większość prokoagulantów wywiera swoje działanie w późniejszej części kaskady, aktywując czynnik X lub protrombinę, albo działając bezpośrednio na przekształcenia fibrynogenu w fibrynę. Jednak fosfolipazy sekrecyjne znajdujące się w jadach węży rodziny *Viperidae* wykazują silne działanie antykoagulacyjne. Mechanizm niezależny od ich aktywności enzymatycznej pozwala na bezpośrednie związanie się fosfolipazy z czynnikiem krzepnięcia Xa, skutkiem czego jest zablokowanie aktywacji protrombiny i powstania fibryny. Do fosfolipaz sekrecyjnych wiążących czynnik Xa należą miotoksyna II z *Bothrops asper* i dwie izoformy podjednostki CB krotoksyny (CBc i Cba2) z *Crotalus d. terrificus* oraz dwie izoformy ammodytoksyny (AtxA i AtxC) z *Vipera ammodytes* [20].

Porównanie struktur AtxA, AtxC ammodytoksyny oraz dwóch izoform podjednostki CB krotoksyny (CBc i Cba2) pokazuje, że izoformę AtxC cechuje 12-krotnie niższe powinowactwo do czynnika Xa niż AtxA, natomiast izoforma Cba2 krotoksyny łączy się z FXa 86 razy słabiej niż CBc [20]. Niższe powinowactwo Cba2 może zostać wytłumaczone tym, że w obrębie struktury izoformy Cba2 występuje punktowa mutacja powodująca zamianę reszty glicyny-128 na resztę kwasu glutaminowego. Dodatkowa substytucja reszty histydyliny-1 resztą seryny także może tłumaczyć różnice we właściwościach antykoagulacyjnych dwóch izoform podjednostki CB krotoksyny [21]. O sile wiązania toksyny z czynnikiem krzepnięcia oraz o jej toksyczności świadczą takie parametry jak LD<sub>50</sub> (letalna dawka toksyny, która powoduje zgon połowy osobników poddanych eksperymentowi) i  $k_{off}$  (jest to parametr kinetyczny opisujący oddziaływanie białko-białko, który definiuje stabilność kompleksu PLA<sub>2</sub>-czynnik Xa, obliczony metodą powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR)). Wyniki doświadczeń opisanych w pracy [20] pokazują, że LD<sub>50</sub> dla izoformy CBc wynosi 93 μg/kg, a dla Cba2 435 μg/kg. Oznacza to, że izoforma CBc jest bardziej toksyczna. W przypadku kompleksu FXa-CBa2 stała  $k_{off}$  wynosi  $1,5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ , natomiast  $k_{off}$  kompleksu FXa-CBc ma wartość  $1,6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ . Analizując te dane może-

my wnioskować, że kompleks izoformy CBa2 z czynnikiem Xa jest mniej stabilny od kompleksu utworzonego przez CBc. Jak pokazały analizy aktywności PLA<sub>2</sub>, oddziaływania z FXa nie wpływają na szybkość katalizowanej reakcji [22].

Poznanie przestrzennej struktury fosfolipaz z jądów *Crotalus* i *Vipera* umożliwiło identyfikację reszt aminokwasowych zaangażowanych w tworzenie kompleksu FXa-PLA<sub>2</sub> i stworzenie modelu tego kompleksu [23]. Podczas wiązania się fosfolipazy sekrecyjnej IIA ammodytoksyny z czynnikiem Xa istotną rolę odgrywa struktura β-kartki i C-koniec białka enzymatycznego. Najważniejszymi resztami aminokwasowymi są Arg72, Lys74, His76 i Arg77 wchodzące w skład β-kartki oraz Arg118, Lys128, Lys127 i Lys132 z regionu C-terminalnego [24]. Aminokwasy te należą do aminokwasów zasadowych i posiadają ładunek dodatni, dzięki czemu mogą oddziaływać z kwasowymi resztami aminokwasowymi czynnika krzepnięcia Xa. Wyróżnić możemy dwa regiony, region A zawierający reszty aminokwasowe 1-19 oraz 52-77 należące do α-helis i struktur β, a także region B zbudowany z reszt 23-34 i 118-133 związanych z fragmentem pętli wiążącej wapń i C-końcem. Łańcuch ciężki czynnika Xa przyłączony zostaje do regionu B, natomiast łańcuch lekki z regionem A fosfolipazy [20,24].

## PODSUMOWANIE

U ssaków zostało zidentyfikowanych ponad 30 enzymów o aktywności fosfolipaz A<sub>2</sub>. Około jedna trzecia z nich należy do grupy sekrecyjnych PLA<sub>2</sub>, które są białkami o niewielkiej masie cząsteczkowej z diadą katalityczną złożoną z His48 oraz Asp99 w centrum aktywnym i które wymagają milimolowego stężenia wapnia do zajścia reakcji enzymatycznej. Poszczególne sPLA<sub>2</sub> mają różną lokalizację subkomórkową oraz właściwości enzymatyczne, co świadczy o tym, że pełnią różnorodne funkcje biologiczne. Aktywacja omawianych enzymów jest kluczowym procesem dla regulacji całej kaskady kwasu arachidonowego, który pod wpływem cyklooksygenaz i lipooksygenaz jest dalej metabolizowany do prostaglandyn oraz leukotrienów. Fosfolipazy sekrecyjne biorą więc udział w syntezie wielu efektorów przekazywania sygnałów w komórce i dlatego są niezwykle istotne w regulacji metabolizmu, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych takich jak np. stany zapalne.

Oprócz wyżej wymienionych funkcji fosfolipaz związanych z ich aktywnością enzymatyczną, niezwykle interesująco rysuje się rola tych polipeptydów w specyficznej regulacji funkcji rozmaitych białek. Sekrecyjne PLA<sub>2</sub> stanowią jeden ze składników jądów węży z rodziny zmijowatych (*Viperidae*). Neurotoksyny znajdujące się w tym jądzie to białka działające presynaptycznie i w większości pochodzące z grupy IIA tych enzymów. Należą do nich m.in. ammodytoksyna, krotoksyna czy też β-bungarotoksyna. Fosfolipazy sekrecyjne znajdujące się w jądach węży rodziny *Viperidae* wykazują silne działanie antykoagulacyjne. Mechanizm niezależny od ich aktywności enzymatycznej pozwala na bezpośrednie wiązanie się fosfolipazy z czynnikiem krzepnięcia Xa, skutkiem czego jest zablokowanie aktywacji protrombiny i powstania fibryny. Liczba białek swoiście wiążących sekrecyjne PLA<sub>2</sub> ciągle jest uzupełniana, np. o kanał

CFTR. Badania fosfolipaz znajdujących się w jądach węży są pomocne w próbach zrozumienia i rozszyfrowania wielu mechanizmów komórkowych na poziomie molekularnym, a ponadto umożliwiają projektowanie nowych leków.

## PIŚMIENNICTWO

1. Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G (2011) Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* 111: 6130-6185
2. Kudo I, Murakami M (2002) Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68: 383-399
3. Sadurska B, Szumilo S (2005) Phospholipases A in mammalian cells: structure, properties, physiological and pathological role. *Post Hig Med Dośw* 29: 116-123
4. Pan YH, Yu BZ, Berg OG, Jain MK, Bahnson BJ (2002) Crystal structure of phospholipase A2 complex with the hydrolysis products of platelet activating factor: equilibrium binding of fatty acid and lysophospholipid-ether at the active site may be mutually exclusive. *Biochemistry* 41: 14790-14800
5. Gijón MA, Leslie CC (1997) Phospholipases A2. *Semin Cell Dev Biol* 8: 297-303
6. Yedgar S, Lichtenberg D, Schnitzer E (2000) Inhibition of phospholipase A(2) as a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 1488: 182-187
7. Scott DL, White SP, Otwinowski Z, Yuan W, Gelb MH, Sigler PB (1990) Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. *Science* 250: 4987: 1541-1546
8. Burdan F, Chałas A, Szumilo J (2006) Cyclooxygenase and prostanoids – biological implications. *Post Hig Med Dośw* 60: 129-141
9. Yagami T, Ueda K, Asakura K, Hori Y (2001) Deterioration of axotomy-induced neurodegeneration by group IIA secretory phospholipase A2. *Brain Res* 91: 230-234
10. Sribar J, Krizaj I (2011) Secreted Phospholipases A2 - not just Enzymes. *Acta Chim Slov* 58: 678-688
11. Higashino K, Ishizaki J, Kishino J, Ohara O, Arita H (1994) Structural comparison of phospholipase-A2-binding regions in phospholipase-A2 receptors from various mammals. *Eur J Biochem* 225 :375-382
12. Nicolas JP, Lin Y, Lambeau G, Ghomashchi F, Lazdunski M, Gelb MH (1997) Localization of structural elements of bee venom phospholipase A2 involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. *J Biol Chem* 272: 7173-7181
13. Faure G, Xu H, Saul FA (2011) Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β-neurotoxin. *J Mol Biol* 412: 176-191
14. Kini RM, Doley R (2010) Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon* 56: 855-867
15. Montecucco CI, Rossetto O, Caccin P, Rigoni M, Carli L, Morbiato L, Muraro L, Paoli M (2009) Different mechanisms of inhibition of nerve terminals by botulinum and snake presynaptic neurotoxins. *Toxicon* 54: 561-564
16. Ostrowski M, Porowska D, Prochnicki T, Prevost M, Raynal B, Baron B, Sauguet L, Corringier PJ, Faure G (2016) Neurotoxic phospholipase A2 from rattlesnake as a new ligand and new regulator of prokaryotic receptor GLIC (proton-gated ion channel from *G. violaceus*). *Toxicon* 116: 63-71
17. Corringier PJ, Poitevin F, Prevost MS, Sauguet L, Delarue M, Changeux JP (2012) Structure and pharmacology of pentameric receptor channels: from bacteria to brain. *Structure* 20: 941-956
18. Faure G, Bakouh N, Lourdel S, Odolczyk N, Premchandrar A, Serval N, Hattou A, Ostrowski MK, Xu H, Saul FA, Moquereau C, Bitam S, Pranke I, Planelles G, Teulon J, Herrmann H, Roldan A, Zielenkiewicz P, Dadlez M, Lukacs GL, Sermet-Gaudelus I, Ollero M, Corringier PJ, Edelman A (2016) Rattlesnake phospholipase A2 increases CFTR-chloride channel current and corrects ΔF508CFTR dysfunction: impact in cystic fibrosis. *J Mol Biol* 428: 2898-2915

19. Faure G, Xu H, Saul F (2010) Anticoagulant phospholipases A<sub>2</sub> which bind to the specific soluble receptor coagulation factor Xa. W: Kini M red. Toxins and hemostasis. Springer Science + Business Media B.V. pp. 201-217
20. Faure G, Gowda VT, Maroun RC (2007) Characterization of a human coagulation factor Xa-binding site on Viperidae snake venom phospholipases A<sub>2</sub> by affinity binding studies and molecular bioinformatics. BMC Struct Biol 7: 82
21. Saul FA, Prijatelj-Znidarsic P, Vulliez-le Normand B, Villette B, Raynal B, Pungercar J, Krizaj I, Faure G (2010) Comparative structural studies of two natural isoforms of ammodytoxin, phospholipases A<sub>2</sub> from *Vipera ammodytes ammodytes* which differ in neurotoxicity and anticoagulant activity. J Struct Biol 169: 360-369
22. Ostrowski M, Prijatelj-Žnidaršič P, Raynal B, Saul F, Faure G (2014) Human coagulation factor Xa prevents oligomerization of anti-coagulant phospholipases A<sub>2</sub>. Toxin Rev 33: 42-47
23. Faure G, Saul F (2012) Structural and Functional Characterization of Anticoagulant, FXa-binding Viperidae Snake Venom Phospholipases A<sub>2</sub>. Acta Chim Slov 58: 671-677
24. Prijatelj P, Charnay M, Ivanovski G, Jenko Z, Pungercar J, Krizaj I, Faure G (2006) The C-terminal and beta-wing regions of ammodytoxin A, a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from *Vipera ammodytes ammodytes*, are critical for binding to factor Xa and for anticoagulant effect. Biochimie 88: 69-76

## Enzymatic and non-enzymatic functions of secreted phospholipases A<sub>2</sub>

Anna Król<sup>1</sup>, Maciej Ostrowski<sup>2,✉</sup>

<sup>1</sup>Chair of Environmental Chemistry and Bioanalytics, Faculty of Chemistry, Nicolaus Copernicus University, 7 Gagarina St., 87-100 Toruń, Poland  
<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, Nicolaus Copernicus University, 1 Lwowska St., 87-100 Toruń, Poland

✉e-mail: maciejost@umk.pl

**Key words:** phospholipase A<sub>2</sub>, phospholipids, neurotoxins, coagulation factor Xa,

### ABSTRACT

Phospholipases catalyze enzymatic degradation of membrane lipids. The phospholipases are divided into four major groups: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, C, and D by the type of ester bond which is hydrolyzed. Phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) hydrolyze membrane glycerophospholipids at *sn*-2 position releasing lysophospholipid and free fatty acid. The PLA<sub>2</sub>s are involved in biosynthesis of intracellular messengers (eicosanoids), endo- and exocytosis, and cytoskeleton reorganization. Moreover, secreted PLA<sub>2</sub> play various functions which are not dependent on their enzymatic activity. An intriguing question is specific interaction of sPLA<sub>2</sub> from snake venom with several protein acceptors (human coagulation factor Xa or CFTR). In this review, we describe classification of PLA, mechanism of catalytic action, as well as interactions of snake venom PLA<sub>2</sub> with various human proteins.